



TITLE:

〔第2篇〕澱粉カラムを使用した血清電気泳動分画による遅延型皮膚感受性の受身移行の企て(遅延型皮膚アレルギー感受性の受身伝達に関する研究)

AUTHOR(S):

大城, 盛夫

CITATION:

大城, 盛夫. 〔第2篇〕澱粉カラムを使用した血清電気泳動分画による遅延型皮膚感受性の受身移行の企て(遅延型皮膚アレルギー感受性の受身伝達に関する研究). 京都大学結核研究所紀要 1964, 12(2): 176-181

ISSUE DATE:

1964-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/51873>

RIGHT:

遅延型皮膚アレルギー感受性の受身伝達に関する研究

〔第2篇〕 澱粉カラムを使用した血清電気泳動分画による 遅延型皮膚感受性の受身移行の企て

京都大学大学院学生（主課目担当教授 西尾雅七）

京都大学結核研究所第2部研究員（主任教授 辻 周介）

大 城 盛 夫

（昭39. 2. 26受付）

緒 言

1954年 Kunkel¹⁾ は澱粉カラムを使用することにより、血清の電気泳動分画を容易に、しかも大量に入手し得る方法を発案した。教室の川田 (1959)²⁾はこの方法を使用して血清抗体の分離を志し、卵白アルブミン (EA) 感作動物血清分画に沈降、血球凝集反応系の抗体を同定し、更に Arthus 反応を担う抗体の分布位置を決定しようとした。彼は更に同じ方法を結核アレルギー抗体の分析に援用し、感作動物血清中にツベルクリン（「ツ」）反応抗体の有無を定めようと企てたが、この試みは結核感作動物血清にみられる沈降、血球凝集両反応抗体をその γ -globulin 分画に同定し得たにとどまった。

著者は結核感作時にみられる抗原抗体系の複雑さ、更に「ツ」反応抗体の血清による移行の不成功という従来の成績を考慮して、先づ第1篇において遅延型皮膚反応のうち更に簡単で、更に明瞭な反応系の発見につとめ、遂に Leskowitz and Waksman³⁾の行つた牛血清アルブミン (BSA) に Freund の adjuvant を添加し、家兎の足蹠皮下に接種して感作するという方法が、この目的に合することを知った。従って以下この方法によって感作した動物血清を電気泳動で分画し、得られた分画による遅延型皮膚反応感受性の受身移行の可能性を探求する実験を行った。

実験材料及び実験方法

実験動物：体重 2～3kg の白色家兎を使用した。

動物の感作：第1篇と同じく、BAS 25mg に Freund の complete adjuvant を加えて足蹠皮下注射を行った。感作 2～3 週間後、BSA 遅延型感受性の成立を確認した後、心臓穿刺によって血液を採取し、室温に放置して血清を分離した。

血中抗体価測定方法

1) 沈降反応抗体価の測定：村田の試験管を使用する重層法を用い、血清倍数稀釈によってその抗体価を決定したが、その際 1,000 倍稀釈の EA 及び 1,000 倍稀釈の牛血清 (BS) 或いは BSA 生食水溶液を抗原として使用した。

2) 凝集反応抗体価の測定：BS 或いは BSA を抗原とする場合には、第1篇に述べたと同様に Boyden 氏の方法を使用し、タンニン酸処理した羊赤血球に BS 或いは BSA を吸着させ、これを凝集抗原として使用した。EA 抗原の場合には進藤 (1956)⁴⁾の記載に従ってタンニン酸処理をすることなく、単に羊赤血球を EA 100 倍生食水液で感作し、これを抗原として感作血清またはその分画との間で凝集反応を行った。

血清の Zone electrophoresis：Kunkel (1954)¹⁾の方法に従い、澱粉カラムによる血清分画を行った。即ち、局方精製馬鈴薯澱粉を使用し、蒸

溜水で数回洗滌した後、乾燥粉末として保存し、使用に際してこれにペロナル緩衝液 (pH = 8.6, $\mu=0.05$) を加えて泥状となし、合成樹脂製泳動槽 (2×5×45cm) に充填する。濾紙で余分の緩衝液を除去した後、カラムの中央部で幅 1cm の範囲に澱粉片を除去して血清充填部を用意する。約9gの乾燥澱粉に被検血清 7~10ml を混じて泥状とし、これを先に用意したカラム欠損部に充填する。槽内に間隙のない様に蓋をして附属金属止具で緊縛し、カラムの両端を濾紙で封じ、更に上を新しいガーゼで覆った後、そのガーゼの遊離端を緩衝液槽に浸してカラムを泳動装置に装着する。しかる後、2mA/cm² (カラム断面)、250Vで約30時間、4℃の恒温室内で泳動を行う。泳動終了後澱粉カラムを1cm毎に切断して試験管に移し、各試験管に10ml宛の生食水を加えて攪拌し、一夜氷室に放置して抽出を行った。各試験管より各0.2mlの資料をとり、Folin-Ciocalteanの方法によりフェノール試薬で発色させ、これをColemanの比色計で蛋白濃度を測定し、蛋白分布曲線を描いた。この曲線から血清分画、即ち albumin, α -, β - 及び γ -globulinを決定した。albumin分画の峰が2つ以上ある場合は、原点より陽極側に向って I, II 或いは III と命名し、同様に γ -globulin の峰にも原点より陰極側に向って I 或いは II の記号を付けた。

受身移行に用いる血清分画の作成方法：電気泳動によって得られた分画抽出液を、第1図にみられる様に、各蛋白の泳動部位に一致して数本宛プールする。これらの分画をセロファン膜を用いて流水中で一夜透析した後、凍結減圧乾燥機にかけて濃縮し、Seitzで濾過滅菌を行って移入のための資料とした。

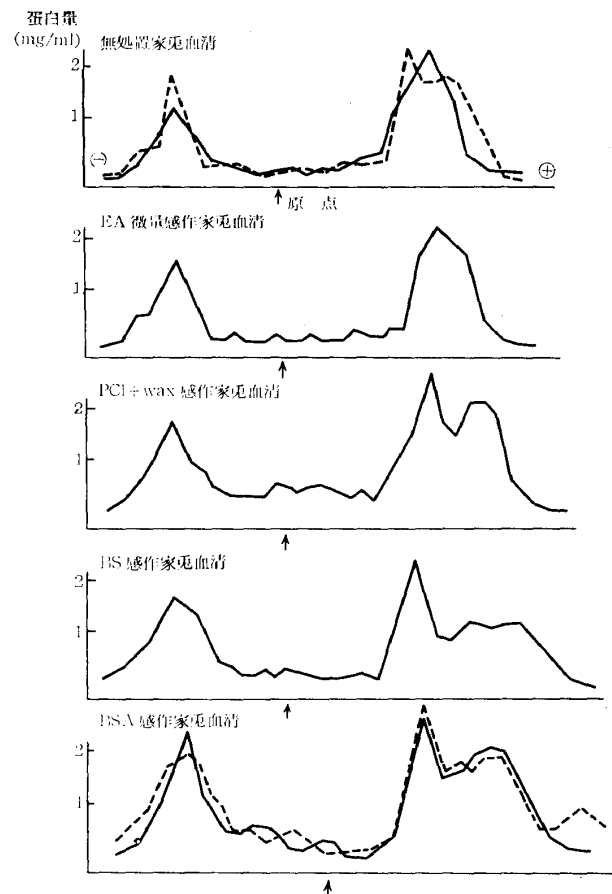
受身移行の方法：第1篇の記載と同じく Prausnitz-Küstner 法に従って、無処置健康家兎の側腹部皮内に各資料の 0.2ml を注射し、24時間後に同じ局所皮膚に BSA の 0.1% 生食水溶液 0.1ml を注射し、一定時間後にその成績を判定した。

実験成績

1) 電気泳動による血清蛋白の分画

泳動した血清の、カラムにおける蛋白分布は、Tiselius の装置によって得られるものと本質的には略々同様であったが、感作に伴ってその泳動像に多少の変化が認められた。

第1図 無処置及び感作家兎血清の Zone Electrophoresis



正常家兎血清の泳動像は、第1図に示された様に albumin, γ -globulin の2峰が著明であり α - 並びに β -globulin は比較的明瞭に出るとき、全くその同定に苦しむ場合とがあった。図に破線で示した様に、ときに albumin が2峰にわかれる場合がみられたが、これ等は後述する様に、何等かの強い感作が自然のうちにこの動物に起っていて、これが非特異的な代謝異常を動物に招来したために斯様な変化が現われる可能性もあるものと思われた。EAの強力な静脈内感作によって、家兎血清中の γ -globulin 量の増加は著明でなく、albumin 峰が I, II の2つに分離することが、川田の実験で指摘された。著者の行った微量 EA の一回感作の方法では、albumin 峰の分峰が現われず、その泳動像

は正常家兎のそれと殆んど全く同じであった。

Picryl chloride に Freund の adjuvant を加えて感作した場合には、川田が指摘した様に albumin の 2 峰が現われた。またこのとき α -及び β -globulin 部位での蛋白量の増加が認められた。

BS 或いは BSA で感作した場合の家兎血清でも、同じく albumin 峰の分峰が出現した。このとき albumin 第 II 峰が更に小さい峰に分れ、albumin II, III 峰として出現する場合のあることが認められた。

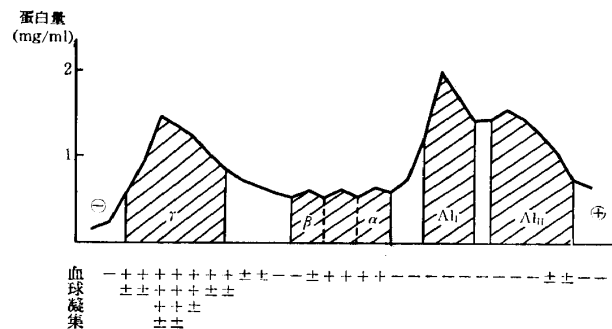
2) 感作血清泳動分画の沈降及び血球凝集反応

EA 感作家兎血清の電気泳動分画について EA または EA 感作羊血球を抗原として、沈降、

血球凝集の両反応を検したが、凡ての分画で陰性の成績を得た。

BS 及び BSA 感作家兎血清での成績は殆んど同様で、BSA 感作家兎血清分画における沈降、血球凝集両反応の成績を第 2 図に模式的に示しておいた。即ち泳動分画の各試験管毎の凝集反応では、 γ -と $\alpha + \beta$ -globulin 部位に反応陽性の成績を得た。反応は γ -globulin 部の陰極寄りでも最も高く、抽出液の倍数希釈約 3 本まで陽性で、この抽出液が原血清の約 30 倍希釈に相当することから、その抗体価は約 120 倍と計算することが出来るであろう。即ちこの方法で血中抗体が僅かながら精製され得たということが出来る。

第 2 図 BSA 足蹠感作家兎 No. 60+No. 61 の血清



プールした分画	γ	$\beta + \alpha$	Al I	Al II
沈 降 反 応	+	- -	-	-
凝 集 反 応	+	+ +	-	-
皮 膚 反 応	+	+	-	-

表 1 BSA 感作家兎全血清による Prausnitz-Küstner 型皮膚過敏反応

Donor No.	感作後 日 数	遅延型皮膚反応(時間)			血清凝 集 価	Recip. No.	注射部位	反 応 発 赤 径 (時間)				
		3	24	48				2	12	24	48	72
44	14	5×5	25×25	23×23	64	58	右 側腹 上	(15×15)	(10×10)	(10×10)	(7×7)	(3×3)
45	14	5×5	15×15	13×13	64	58	左 " 上	(10×10)	(10×10)	(10×10)	(10×10)	(6×6)
46	14	10×15	25×25	25×25	128	58	右 " 下	12×12	(10×10)	(10×10)	(10×10)	(7×7)
47	14	5×5	20×20	20×20	64	58	左 " 下	(10×10)	(10×10)	(10×10)	(10×10)	(6×6)
49	14		19×20	15×19	64	255	右 " 上	(10×10)	10×10	0	0	0
50	14		20×20	10×10	256	255	左 " 上	12×12	10×10	0	0	0
60	14	10×15	25×25	25×25	32	255	右 " 下	(10×10)	8×8	0	0	0
61	14	6×6	30×30	30×30	64	255	左 " 下	10×10	10×10	0	0	0

() は弱反応を示す。反応の大きさはmmで表示。

3) 感作動物血清による皮膚過敏性受身移行の確認

先づ全血清によって BAS 感作家兎皮膚過敏性の受身移行の可能性を検討した。その成績は第1表の通りで、惹起注射後12時間程度継続する亜遅延型の反応が認められた。しかしその反応はたかだか 15mm 前後であり、Prausnitz-Küstner 型の反応としては強いものではなかった。

4) 感作動物血清電気泳動分画による皮膚過敏性の受身移行

得られた成績の若干を第2表として示し、またこれを模式的に第2図の中に併記した。元来 Prausnitz-Küstner 型の反応は非特異的な炎症刺激が反応に参加する機会が多く、その結果の判定にしばしば困難を来す場合があって、得られた成績の中でもこれを放棄しなければならなかった場合もあった。しかし得られた結果を通覧すれば、皮膚反応性の過敏抗体が分画中の γ -globulin 及び $\alpha + \beta$ -globulin 分画中にあり、これ等の分画を注射した群では、その非特異的な皮膚刺激の存在にも拘らず、局所皮膚反応は抗原液の注射によって明らかに増強され、略々これをアレルギー反応と解することが出来る成

績を得た。しかしこの際みられた皮膚反応は即時型に近く、2～4時間で最強度となり、24時間後には多くのものが陰性または弱反応を残すに過ぎなかった。尚これ等の分画による感受性の全身の受身移行は行わなかったが、以上の成績からして、BS 或いは BAS 感作時にみられる組織反応性の抗体は、その血清中の globulin 分画中に広く分布し、その抗体分布は略々血球凝集反応に示される抗体分布域と軌を一つにするものであることがうかがえる。：

考 按

教室の川田は澱粉カラムを使用して、家兎及びモルモットの血清の電気泳動による分析を行って、その正常及び感作血清のパターンを決定し、併せて感作血清中の抗体位置を明らかにしようとして企てた。著者は感作家兎血清中の各種抗体の抽出に当って川田の方法を踏襲し、多くの点で彼の記載と一致する成績を得た。即ち感作家兎血清においては、その albumin 相当峰に明らかな峰が2つ或いはそれ以上現われることで、川田は感作の進行と共にその第1峰が高くなると述べている。彼の成績は感作によって得られたものであるが、著者の実験では EA 或い

表2 BSA 感作家兎血清電気泳動分画による皮膚過敏性の受身移行(Prausnitz-Küstner法)

Donor No.	感作後日数	遅延型皮膚反応(時間)			血球凝集価	Recip. No.	血清分画	反 応 発 赤 径 (時間)					
		3	24	48				直後	2	4	12	24	48
60	14	10×15	25×25	25×25	32	257	γ -gl	10×10	10×10	20×20	15×20	0	0
61	14	6×6	30×30	30×30	64		$\alpha + \beta$ -gl	(17×10)	8×8	20×20	13×13	0	0
							alb I	(15×15)	0	0	0	0	0
							alb II	(15×15)	0	0	0	0	0
45	14	5×5	15×15	13×13	64	57	γ -gl I	6×6	10×10		10×10	7×7	7×7
							γ -gl II	6×6	20×20		20×20	6×6	6×6
47	14	5×5	20×20	20×20	64		β -gl	6×6	15×15		15×15	6×6	5×5
							alb I	7×7	10×10		10×10	5×5	5×5
							alb II	6×6	10×10		10×10	5×5	5×5
49	14		19×20	15×19	64	256	γ -gl	8×8	7×7	20×20	10×10	10×10	0
							$\alpha + \beta$ -gl	0	8×8	20×20	13×13	10×10	0
50	14		20×20	10×10	256		alb I	0	12×12	12×12	10×10	0	0
							alb II	0	0	10×10	3×3	0	0
							alb III	0	0	5×5	5×5	0	0

() は弱反応を示す。反応の大きさはmmで表示。

は BSA 感作及び Picryl chloride 感作によってこの albumin の 2 峰性が出現した。これ等は何れも強力感作の際にみられるもので、EA の微量感作の場合には、これ等の感作動物には皮膚遅延型反応が出現し、明らかにその感作状態の存在を示しているにも拘らず、albumin の 2 峰性は出現しなかった。著者の行った実験では、無処置の家兎の一部にも、albumin の軽度の分峰がみられた場合がある。しかしこれ等の例外は、使用された動物が、実験室外において何らかの感作或いは感染を被ったことによるものと解する方が妥当である。また強力感作の動物において、albumin の第 2 峰が更に分峰して第Ⅲの峰を作る場合も認められた。これらの分峰の原因に関しては、尚著者は実証的なデータを有しない。唯この albumin 分画に抗体を証明することが全く出来なかった事実から、感作処置によって起された非特異的な代謝障害が、この現象を招来したものと推察するに留まっている。

γ -globulin に関しては、感作処置によるその増量が家兎においては著明でない。この点も川田の記載に一致する。ただ強力感作の場合には、 α - または、 β -globulin 部位の蛋白量の増加を伺うことが出来た。

血中抗体価の測定を BS 或いは BSA について行った。川田の記載では EA に対する血中抗体は γ -globulin 部にのみを出現すると述べられている。しかし著者が行った BS または BSA 感作では、沈降抗体は γ -globulin 部に現われたが、Boyden の方法による血球凝集を用いれば、その抗体は α - 及び β -globulin 部にも現われた。周知の様に血球凝集反応は沈降反応より鋭敏で、ために α , β -globulin 部の微量の抗体が検出し得たものと思われるが、 α , β -globulin 部の血球凝集抗体が、 γ -globulin の混入によるものか、或いは α , β -globulin 部に固有のものか尚今後の検討を要するところである。ただこれらの分画の移入により、皮膚反応を起す抗体が同じく $\alpha + \beta$ -globulin, γ -globulin 部に存在することが示された。従って微量の血中抗体の存在と、皮膚反応抗体との関連も尚追求さ

れなければならない問題として残されている。AE 感作家兎血清に沈降抗体が、澱粉カラム法による泳動で分画された γ -globulin 部に検出されることは川田の記載の如くである。しかし著者の実験では、抗 EA 抗体を感作家兎血清に証明出来なかった。これはその感作が、微量の抗原投与によってなされたことによるもので、この血清に沈降抗体が証明出来なかったとしても異とするに当たらない。しかし血球凝集抗体までも原血清及び分画中共に検出出来なかったことは一考の余地がある。この場合に血球凝集反応としては、進藤による未処置血球 EA 吸着法が抗原作成手技として用いられ、為に抗原による血球処理に不備を来したものか、或いは使用された EA に混在する conalbumin が Stavitsky (1954)⁹⁾ の記載した様に EA 血球凝集を妨げて、その抗体の検出を誤らせたものか、何れかと思われるのであって、著者の成績が直ちに皮膚反応と血中抗体との解離を示すものではない。BS または BSA による感作の場合にも、研究の初期には進藤の直接法による血球凝集反応が行われ、この場合にも同様に抗体の検出を誤ったが、その後羊血球にタンニン酸処理を加えることにより、反応陽性の成績を得ることが出来た。しかしてこの場合には血球凝集抗体と皮膚反応抗体との併存を認める結果となったのであるが、このことは必ずしも両抗体の一元性を示すものではない。

従来家兎の Arthus 反応は、古く Nicolle (1906)⁶⁾ の感作血清による passive transfer, 更に Opie (1923)⁷⁾ による研究で、略々その感作血清に現われる沈降抗体量と併行して推移することが認められ、モルモットのアナフィラキシー反応さえ、組織に吸着された血中抗体によって惹起されるものと考えられてきた。他方では Cooke ら (1935)⁸⁾ の blocking antibody 説に始り、血中抗体の多元説、殊に皮膚感作抗体と沈降抗体で代表される血中抗体との解離が主張され、Sherman ら (1950)⁹⁾ は EA 感作家兎血清で、その皮膚感作抗体は non-precipitating antibody であると推定した。その後血清蛋白を分画する各種の方法が考案され、分画におけ

る抗体の分布を定めること、並びに分画による抗体の精製が企てられ、数多くの業績が発表されてきた。これらの研究により、以下のことが判明した。即ち(1)抗体は感作の時期によって変遷し、その分子量、荷電系の変化と共に、出現する分画位置が変動するものであり、(2)抗原、または感作法が異れば、それに対する抗体は異った分画に出現する可能性がある。(3)一定の感作によって出現する血中抗体は多元的で、それらの出現する分画はグロブリンの各種の分画にわかれて含まれる場合がある。

さて本実験を行った著者の関心は、遅延性として一括される特殊な皮膚反応の由来する抗体が、組織に親和性を有する特殊な抗体か、或いは血中にも出現し得る一般的な抗体か否か、またそれが血中抗体として同定し得るものであるならば、果してそれは沈降抗体その他の試験管反応で検出し得る抗体と同一のものか否かということにあった。そしてこれを明らかにする手段として、澱粉カラムによる感作血清の分画を行い、各分画における抗体性蛋白の有効度を、試験管内試験と皮膚反応感受性受身伝達能とを併用することにより決定しようとしたのである。

得られた著者の実験成績では、BS またはBSA 感作時の皮膚反応性抗体が、 γ のみならず $\alpha + \beta$ -globulin 分画にも現われた。しかしこの成績は Prausnitz-Küstner 法によって得られたもので、非特異反応の強いこの試験では、得られた結果も尚一步確実さに欠けるうらみがある。しかし $\alpha + \beta$ 分画に反応陽性物質の存在を認めたことは、人の皮膚過敏症の reagin が同じく α または β -globulin 中に存在するという、Menzel ら (1951)¹⁰⁾、Campbell ら (1954)¹¹⁾ Loveless ら (1953)¹²⁾、の報告と軌を一にし、また Schon ら (1955)¹³⁾ の有効成分が主に、 γ に、また β にも存在するという成績にも通ずるものである。しかし著者の実験では、皮膚感作抗体存在分画は同時に赤血球凝集反応陽性部位であり、ここに微量の血中抗体の存在を否定出来なかった。従って遅延型の皮膚反応を示す感作状態を担う抗体が、Arthus 型反応の抗体と、或いはまた試験管反応陽性の血中抗体と、

全く異ったものであるかどうかということに対する何等の示唆も、今回の実験からは得ることが出来なかった。何れにしろ遅延型の皮膚反応を担う抗体が、果して血中に存在するかどうか、或はそうだとした場合の血中の微量の抗体と、組織反応性の抗体とが同質のものであるかどうかということは、尚引続いて検索する必要がある。

総 括

1) 澱粉カラムによる血清の電気泳動を行えば、強力に感作を行った家兎の血清では、その albumin 分画の部分に 2 個或いは 3 個の峰が出現する。

2) 感作によって血中に出現する抗体は、澱粉カラム法によっても γ -globulin 部位に沈降抗体として現われる。加えて Boyden 法によって血球凝集反応を検すると、微量の凝集抗体が γ -globulin 分画に加えて α , β -globulin 分画部にも現われる。

3) 感作動物における皮膚反応性の抗体は、感作血清の γ -globulin 及び $\alpha + \beta$ -globulin 分画によって他の動物に移行することが出来、移行された過敏性は即時型反応として現われる。

附記：稿を終るに臨み、本研究の指導並びに本稿の校閲に御尽力をたまわった本研究所の安平公夫助教授に、研究遂行に当って御協力を戴いた川田典徳博士並びに小原幸信博士に感謝の意を捧げます。

参 考 文 献

- 1) Kunkel, H.G.: Methods of Biochemical Analysis, 1:141, 1954.
- 2) 田典徳：京結紀要, 8 (2): 51, 62, 昭34.
- 3) Leskowitz, R., & Waksman, B. H.: J. Immunol., 84: 58, 1960.
- 4) 進藤宙二：血清学の新しい見方と考え方 (医学書院) 1956.
- 5) Stavitsky, A.B.: J. Immunol. 72: 360, 1954.
- 6) Nicolle, M.: Annales de l'Institut Pasteur 20:801, 1906.
- 7) Opie, E.L.: J. Immunol. 8: 55 1923.
- 8) Cooke, R.A., Bernard, J.H., Hebard, S. & Stull, A.: J. Exp. Med., 62: 733. 1935.
- 9) Sherman, W.B., Menzel, A.E.O. & Seeborn, P. M.: J. Exp. Med. 92: 191, 1950.
- 10) Menzel, A.E.O., Lealer, N.R., Cooke, R.A. & Myers, P.A.: J. Allergy, 23: 483, 1951.
- 11) Campbell, D.H., Cann, J.R., Feedman, T.B. & Brown, R.: Science, 119: 289, 1954.
- 12) Loveless, M.H. & Cann, J.R.: Science, 117: 105, 1953.
- 13) Schon, A.H.: IVth International Congress of Allergology, New York, 1961.